Über die Aufnahme von Strontium durch Bodenpilze der Gattungen Aspergillus und Penicillium

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Ernst Fankhauser
aus Langnau BE

1963

Büchler + Co AG Wabern · 1966

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren Dr. Max Geiger-Huber
Dr. Heinrich Zoller

Basel, den 22. Januar 1963

M. Eichler, Dekan

UNIV. LEIDEN BIBL.

Separatabdruck aus «Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft»
1966, Band 76
(Als Sonderdruck ausgegeben am 12. August 1966)

Über die Aufnahme von Strontium durch Bodenpilze der Gattungen Aspergillus und Penicillium

Von *Ernst Fankhauser*

Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel

Manuskript eingegangen am 3. Januar 1966

Inhalt

Seite

Einleitung 6

Methodisches

Kultur der Pilze 7

Aufarbeitung und Analyse 9

Streuung und Signifikanz 10

Experimentelle Ergebnisse

Konzentrationsabhängige Strontiumaufnahme 11

Strontiumaufnahme in physiologisch verschiedenen Stadien 15

Einfluss von Kalium auf die Strontiumaufnahme 18

Einfluss von Calcium auf die Strontiumaufnahme 19

Wirkung der Temperatur auf die Strontiumaufnahme 25

Zum Mechanismus der Strontiumaufnahme 26

Diskussion 33

Zusammenfassung 37

Zitierte Literatur 39

Einleitung

Frühere Untersuchungen über die Aufnahme von Strontium und dessen Wirkung auf den Organismus hatten rein theoretischen Charakter, indem im Mittelpunkt des Interesses die Ersetzbarkeit des Calciums durch Strontium stand. Diesem Problem kommt heute auch praktische Bedeutung zu, weil unter den durch Spaltung schwerer Kerne entstandenen radioaktiven Spaltprodukten das langlebige Strontium 90 eine zentrale Stellung einnimmt. Trotz den vielen bis jetzt vorliegenden Arbeiten wurden fast nur höhere Organismen in Betracht gezogen. Dass aber bei einem Regen radioaktiver Partikel nur die toten Bodenstrukturen und die ober- und unterirdischen Organe höherer Pflanzen radioaktives Strontium adsorbieren bzw. aufnehmen werden (Guliakin in Klechkowsky, 1957), ist wenig wahrscheinlich. Mikroorganismen besitzen, verglichen mit ihrem Volumen, eine weitaus grössere Oberfläche als höhere Pflanzen; durch ihre Säurebildung und engen Kontakt mit dem Substrat (vgl. König, 1961) können zudem viele dieser Lebewesen wasserunlösliche, anorganische Verbindungen, wohl auch Strontium-90-Carbonat, lösen. Daher dürften mehr radioaktive Partikel in den oberen, von Pilzen gut durchwachsenen Bodenschichten zurückgehalten werden, als bei rein physikalisch-chemischen Untersuchungen über ihre Adsorbierbarkeit an verschiedenen Mineralien und Bodentypen festgestellt worden ist (Klechkovsky, 1957).

Der Strontiumaufnahme durch Mikroorganismen wurde aus verschiedenen Gründen wenig Beachtung geschenkt. Einmal herrscht immer noch Unklarheit über die Lebensnotwendigkeit des Calciums für Pilze; daher stellt sich auch kaum das Problem einer Ersetzbarkeit des Calciums durch Strontium, wie es bei höheren Pflanzen besteht. Da selbst die hutbildenden, höheren Pilze für Ernährungszwecke nur am Rande von Bedeutung sind, bestand auch kein spezieller praktischer Grund, sie auf die Aufnahme von radioaktivem Strontium zu untersuchen. Durch die meist saprophytische Lebensweise der Mikroorganismen aber wird in Pflanzen- und Tierresten gebundenes Strontium 90 freigelegt und kann von autotroph lebenden Pflanzen wiederum aufgenommen werden. Schliesslich konkurriert diese Mikroflora mit den Wurzeln höherer Pflanzen um die Aufnahme von Strontium; ein Problem, das von Frei (1963) im hiesigen Institut untersucht worden ist.

Aus den genannten Gründen erschien eine Untersuchung der Strontiumaufnahme durch Bodenpilze von wissenschaftlichem wie auch praktischem Interesse. Zur Untersuchung wurden einige Vertreter der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* ausgewählt. Untersucht wurden einige allgemeine Gesetzmässigkeiten der Strontiumaufnahme unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Da die Frage noch offen ist, ob Calcium als

lebensnotwendiges Element für Pilze gelten kann, wurde auch der Calciumaufnahme und der Wechselwirkung zwischen Calcium- und Strontiumionen in der Aufnahme Beachtung geschenkt.

Methodisches

Kultur der Pilze

Die folgenden Pilze (aus der Sammlung in Baarn, Niederlande) wurden ausgewählt, weil sie auch bei längerer Kultur leicht Sporen bilden: *Aspergillus terreus* Thom 1960, *A. ustus* (Bain.) Thom et Church Abbot, *A. clavatus* Desm. CBS, *A. niger* v. Tieghem A 7, *A. fumigatus* Fres., *A. amstelodami* (Magnin) Thom et Church, *Penicillium citrinum* Thom 806, *P. citrinum* BB 12, *P. frequentans* Westl., *P. expansum* Thom 976, *P. patulum* Bainier NCTC, *P. corylophilum* Dierkx R 802.

Um die Konstanz der physiologischen Eigenschaften möglichst zu erhalten, wurden die Pilze abwechselnd auf Difco-Malzextraktagar (3% mit 1,8% Agar und dest. Wasser) und auf Tomatenagar (50% Tomatenpresssaft, 1,8% Agar und Leitungswasser) kultiviert. Zur Herstellung der Sporensuspension (für *A. terreus* von 3 Wochen alten Kulturen auf Malzextraktagar) wurde Ionenaustauscherwasser mit 0,1% Tween 80 verwendet. Die Sporen wurden einmal während 6 Minuten bei 3000 U/min abzentrifugiert und wieder mit reinstem Wasser aufgenommen und dann in der Zahl von ca. $9 \cdot 10^6$ Sporen pro 150 ml Nährlösung geimpft. Bei dieser Impfstärke waren leichte Schwankungen in der Sporenzahl ohne Wirkung auf das Wachstum.

Die Kulturgefässe (500 ml Pyrex-Erlenmeyer), die jeweils mit dreiprozentiger Salzsäure im Dampftopf ausgekocht, mit einem Waschmittel gereinigt und sorgfältig mit entsalztem Wasser gespült wurden, erhielten je 150 ml Nährlösung folgender, von Emmenegger (1954) übernommener und für vorliegende Arbeit modifizierter Zusammensetzung: 0,04% KH_2PO_4, 0,05% K_2HPO_4, 0,05% $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 0,2% NH_4NO_3, 4% Glukose pro infusione und pro Liter Lösung je 1 ml Hoagland'sche A-Z-Lösung und zweiprozentige Lösung von $FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$ (analysenreine Substanzen von Merck und Analar). Die Nährlösung hatte ein pH von 6,3.

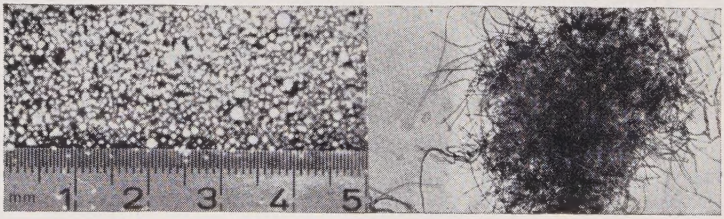
Stets wurde im Ionenaustauscher entsalztes Wasser vom spezifischen Widerstand von $1{,}5–2 \cdot 10^6$ Ohm, für Strontium-Calcium-Versuche[1] vom Widerstand von $10–11 \cdot 10^6$ Ohm verwendet. Um eine Caramelisierung des Zuckers in der Nährlösung zu verhindern, wurde dreimal (im Abstand

[1] Für die bereitwillige Abgabe von Ionenaustauscherwasser dieses Reinheitsgrades danke ich Herrn Ammann in der physikalisch-chemischen Anstalt herzlich.

von 24 Stunden) vorsichtig im strömenden Dampf sterilisiert. Strontium wurde als $SrCl_2$ der Nährlösung zugesetzt. (Chlorionen in der angewandten Konzentration blieben ohne Einfluss auf das Pilzwachstum.) Die Strontiumzugabe erfolgte vor der Sterilisation der Nährlösung, ausgenommen bei einer Konzentration von 1000 γ/ml, wo, zur Verhütung eines Phosphatniederschlages, das Strontium aseptisch nach der Sterilisation zugesetzt wurde. Dabei ergaben sich aber keine Unterschiede in der Entwicklung der Kulturen.

Die Pilze wurden hauptsächlich in Schüttelkulturen gehalten (vergleiche Kluyver und Perquin, 1933; Foster, 1949). Die verwendete Schüttelapparatur ist ausführlich von Schaub (1958) beschrieben worden. Bei einer Frequenz von 70 Schwingungen pro Minute, einer Amplitude von 6,5 cm und zusätzlicher Beschwerung der Schüttelkörbe bildete *A. terreus* Mycelkörner von 0,5–1 mm Durchmesser (Fig. 1). Bei höherer Wasserstoffionenkonzentration wurde das Mycel faserig (vgl. auch Meder, 1952), was das saubere Abnutschen erheblich erschwerte. Auch grosse, kompakte Mycelkugeln waren schwer abzunutschen; zudem hatten diese den Nachteil einer geringen Wachstumsgeschwindigkeit, wodurch Unterschiede zwischen jungen und alten Kulturen verwischt wurden. Es wurde darum die oben angegebene Korngrösse gewählt, weil hier das Wachstum der Pilzhyphen sehr stark und damit ihr Altersunterschied klein war und weil eine saubere und rasche Trennung der Kulturlösung vom Pilz garantiert war.

Unter solchen Bedingungen entstand mit *A. terreus* innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Sporenimpfung eine wolkige Trübung der Kulturlösung (beginnende Bildung von Mycelkörnern). Nach 72 Stunden war das ganze Flüssigkeitsvolumen mit Körnern angefüllt, die im weiteren Verlauf der Kultur eine dichtere Struktur gewannen, aber an Grösse kaum zunahmen (Fig. 1). Die Kulturen waren in Aussehen und Konsistenz einem Griessbrei ähnlich; es werden auch chlamydosporenähnliche Zellen



Figur 1

Aspergillus terreus: 4 Tage altes Griessmycel
Links: natürliche Grösse Rechts: Mycelkorn vergrössert

gebildet, und die Wachstumsgeschwindigkeit nimmt ab. Am 10. Kulturtag ist der Glukosevorrat in der Nährlösung erschöpft; trotzdem ist weiterhin noch eine geringe Trockengewichtszunahme festzustellen, was auf Bildung von Chitin durch Wiederverwertung von Ausscheidungsprodukten beruhen dürfte (Behr, 1930). Die Bildung von Konidiosporen beginnt zwischen dem 12. und 14. Kulturtag. Tote Zellen waren während der ganzen Versuchsdauer (14 Tage) nicht nachzuweisen. Während das pH der Kulturlösung in den ersten Tagen auf ca. 3,0 absinkt und dann stetig wieder ansteigt, nimmt die potentielle Wasserstoffionenkonzentration anfangs stark zu und bleibt später annähernd konstant.

Aufarbeitung und Analyse

Die Kulturlösung wurde auf gewogenen aschefreien Filtern mittels einer Wasserstrahlpumpe vom Mycel getrennt. Dabei verkleinerte sich das Volumen der Pilzkörner je nach Alter auf ein Zehntel bis ein Zwanzigstel der ursprünglichen Grösse. Dann wurde der Sog unterbrochen, so viel entsalztes Wasser zugegeben, als die Mycelkörner zum vollständigen «Wiederaufquellen» benötigten (100–150 ml bei ausgewachsenen Kulturen), und wiederum abgenutscht. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dieser Behandlung liess sich mit Natrium-Rhodizonat (Waterhouse, 1957) kein Strontium an der Aussenseite der Hyphenmembran mehr nachweisen.

Das Frischgewicht wurde unmittelbar nach dem Abnutschen auf einer Schnellwaage bestimmt. Zur Trockengewichtsbestimmung wurde das Mycel in einem ventilierten Trockenofen bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Messung der aktuellen Wasserstoffionenkonzentration wurde mit einem Beckmann-Gerät (Glaselektrode) elektrometrisch durchgeführt.

Das Pilzmycel enthielt grössere Mengen von Fetten und ähnlichen Verbindungen, die sich mit HNO_3 nur schwer veraschen liessen. Trotz drastischer Behandlung (starkem Erhitzen) blieb stets ein Teil dieser Substanzen als klare, viskose Masse in der weissen Asche, was zusammen mit einer eventuellen Oxydbildung durch Überhitzen das Gewicht der als Chlorid gewogenen Asche hätte verfälschen können. Daher wurde das Mycel während einer Stunde in kochender redestillierter HNO_3 gelöst. Bei Erkalten der Lösung erstarrten die Fettsubstanzen an deren Oberfläche. Nach dreimaliger Extraktion mit kochender HNO_3 wurde die fettähnliche Masse verworfen, da nachgewiesenermassen frei von den zu bestimmenden Ionen. Die Lösung wurde nun mit redestillierter, konzentrierter HNO_3 und analysenreiner Wasserstoffperoxydlösung (30 gew.-prozentig) verascht und anschliessend in die Chloridform übergeführt (Pedretti, 1958).

Die Asche wurde mit wenig Wasser und festem $(NH_4)_2CO_3$ im Überschuss versetzt und mehrere Tage stehengelassen, um eventuell gebildete Strontiumsilikate wieder in Lösung zu bringen (Frei, 1963; Läuchli, 1962). Die konzentrierte Analysenlösung enthielt oft zu geringe Mengen Strontium, um dieses als Carbonat quantitativ auszufällen. Daher wurde ganz auf eine Abtrennung der Erdalkali aus der Lösung verzichtet, dafür aber eine Verunreinigung mit Natriumionen möglichst vermieden, weil diese die flammenspektrophotometrische Bestimmung des Strontiums gestört hätten.

Die Konzentration der reinen Lösung von Strontium-, Calcium- und Kaliumchlorid als Zusatz zur Nährlösung und zur Analysenlösung liess sich refraktometrisch nach Wagner (1928) genau bestimmen. Die Konzentration an Strontium in der Aschelösung wurde mit dem Beckmann-Flammenspektrophotometer (Modell DU) bestimmt (Läuchli, 1962). Da, je nach Kulturbedingung der Pilze, die Aschelösung in ihrer Zusammensetzung sehr stark variieren konnte, liess sich Strontium nicht anhand von Eichkurven bestimmen. Die Konzentration der Strontiumionen wurde daher aus den durch Zusatz verschiedener kleiner und bestimmter Mengen Strontium in Proben derselben Analysenlösung erhöhten Emissionen ermittelt (Frei, 1963). Die Konzentration der Calcium- und Kaliumionen in der Aschelösung wurde nach demselben Prinzip festgestellt. In der Flamme des Gasgemisches Sauerstoff–Wasserstoff wurde bei nachstehenden Wellenlängen die Emission der Ionen bestimmt:

Strontium = 460,2 mμ, Calcium = 422,7 mμ, Kalium = 768 mμ

Streuung und Signifikanz

Die Streuung der Mittelwerte von Frisch- und Trockengewicht des Mycels wurde immer aus den Einzelwerten von 5–12 Parallelkulturen berechnet. Um eine unterschiedliche Bildung von Trockengewicht in den Kulturen verschiedener Schüttelkörbe zu vermeiden, wurden die Kulturen nach «Latinsquare» (Fisher und Yates, 1948) auf die Schüttelkörbe verteilt und, vor allem bei Kulturbeginn, die Kulturkolben der Schüttelkörbe mehrmals täglich gegeneinander ausgewechselt. Bei dieser Gelegenheit wurde das an der Wand des Kolbens anhaftende Mycel durch kreisende Bewegung des Kolbens mit Nährlösung abgespült. Derart behandelte, 6 Tage alte Kulturen streuen im Frischgewicht etwa 8%, im Trockengewicht etwa 5%. Die Streuung wird mit dem Alter der Kultur geringer.

In einigen Versuchen wurde das Mycel von Parallelkulturen derselben Versuchsbedingung einzeln aufgearbeitet und analysiert. Um Zeit einzusparen, wurden in anderen Versuchen die Parallelkulturen in 2 bis 4

Gruppen mit annähernd demselben Gewicht aufgeteilt und diese Gruppen analysiert. Für derart aufgearbeitete Versuche wurde anhand spezieller Versuche über die Streuung mit je 8 Parallelkulturen pro Versuchsbedingung die Streuung der Mittelwerte ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass die Streuung der allgemeinen Ionenaufnahme, besonders aber der Strontiumaufnahme, gross ist, wenn Kulturen der gleichen Bedingung verschieden starkes Wachstum zeigen, weil langsam wachsende Kulturen absolut und relativ mehr Strontium aufnehmen. Dabei spielt die Zahl bzw. die Grösse der Mycelkörner pro Kultur eine massgebende Rolle. Mit dem Griessmycel, wie in Figur 1 abgebildet, machen sich Schwankungen in der Kornzahl nur schwach bemerkbar; das Wachstum ist stark und ausgeglichen, und die einzelnen Mycelkörner sind einheitlich in ihrer Zusammensetzung. Die Strontiumaufnahme streut hier maximal 5%. Der methodische Fehler durch die Veraschung ist klein und fällt nicht in Betracht. Die übrige Aufarbeitung der Analysenlösung einschliesslich Bestimmung der Strontiumkonzentration ergibt Fehler bis zu 7%. Die Strontiumaufnahme, bezogen auf das Trockengewicht als meist diskutiertem Wert, streut um 10 bis 12%, bei Untersuchungen mit niederen Strontiumkonzentrationen etwas mehr.

Bei einem Vergleich zweier Mittelwerte wurde zur Berechnung der Signifikanz der t-Test (Fisher, 1946) angewendet. Signifikanz wurde normalerweise angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 1% ($P = 0{,}01$) betrug. Nur in mehreren Werten signifikante Unterschiede werden in der Arbeit diskutiert.

Experimentelle Ergebnisse

Konzentrationsabhängige Strontiumaufnahme

Vorerst wurde die quantitative und qualitative Strontiumaufnahme an verschiedenen Pilzen untersucht, auch um für die später folgenden Versuche einen für die Aufnahme typischen Pilz auszuwählen.

Die strontiumhaltige Nährlösung aller Pilze wurde mit gleicher Anzahl Sporen beimpft und die Strontiumaufnahme durch diese wachsenden Kulturen nach 6 Tagen der Entwicklung bestimmt. Die Versuchsbedingungen waren für alle Pilze gleich, mit Ausnahme des vorher ermittelten Temperaturbereiches für optimales Wachstum (Tab. 1).

Alle untersuchten Pilze verhielten sich in der von der Aussenkonzentration abhängigen Aufnahme qualitativ gleich: bei jeweiliger Erhöhung der Aussenkonzentration an Strontium um Faktor 10 stieg die Aufnahme bei niederen Konzentrationen erst langsam, bei höheren Aussenkonzentrationen aber immer rascher an (Tab. 1). Für die quantitative Aufnahme

Tabelle 1

Aspergillus und *Penicillium:* Konzentrationsabhängige Strontiumaufnahme

Versuchsdauer: 6 Tage, Mycel während dieser Zeit in strontiumhaltiger Nährlösung aus Sporen gewachsen

Impfstärke, für alle Pilze gleich: $9 \cdot 10^6$ Sporen/150 ml

Optimaler Temperaturbereich für Wachstum

9–12 Parallelkulturen

Organismen und Temperatur	Sr-Konzentration γ/ml	Frischgewicht in g	Trockengewicht in mg	Wassergehalt g	Asche/Trockengewicht mg/g	Absoluter Sr-Gehalt γ	Relativer Sr-Gehalt γ/g
Aspergillus	0	6,05	1108 ± 36	4,94	32		
terreus	1	6,39	1106 ± 53	5,28	31	32	30 ± 3
30 °C	10	6,43	1295 ± 61	5,13	30	72	55 ± 4
	100	7,35	1612 ± 85	5,74	30	318	197 ± 24
	1000	6,12	1359 ± 64	4,76	57	6 800	5 005 ± 345
Aspergillus	0	11,48	1012 ± 32	10,47	44		
clavatus	1	9,74	997 ± 32	8,74	44	77	78 ± 4
30 °C	10	9,59	1028 ± 35	8,56	44	123	120 ± 6
	100	9,27	1012 ± 36	8,26	42	332	329 ± 55
	1000	10,82	1149 ± 34	9,67	85	18 660	16 250 ± 900
Aspergillus	0	2,99	581 ± 34	2,41	56		
ustus	1	3,53	678 ± 28	2,85	51	92	134 ± 14
25 °C	10	3,32	732 ± 33	2,59	52	141	192 ± 6
	100	3,74	938 ± 57	2,80	47	596	638 ± 44
	1000	3,78	954 ± 35	2,83	91	36 010	37 800 ± 200
Penicillium	0	9,01	1608 ± 26	7,40	55		
citrinum 806	1	7,68	1522 ± 45	6,16	44	66	44 ± 4
30 °C	10	7,11	1443 ± 71	5,67	41	117	81 ± 3
	100	7,62	1533 ± 93	6,09	40	400	261 ± 13
	1000	8,16	1625 ± 39	6,53	51	10 350	6 360 ± 580
Penicillium	0	5,15	1074 ± 16	4,08	43		
frequentans	1	5,07	1093 ± 59	3,98	42	58	54 ± 7
25 °C	10	4,74	1050 ± 12	3,69	37	73	69 ± 3
	100	4,09	1029 ± 14	3,06	34	161	157 ± 20
	1000	4,22	1017 ± 19	3,20	68	15 780	15 500 ± 850
Penicillium	0	6,28	909 ± 30	5,37	57		
expansum	1	5,56	841 ± 19	4,72	53	80	95 ± 3
25 °C	10	5,20	818 ± 31	4,38	54	94	115 ± 7
	100	5,30	840 ± 16	4,46	52	207	246 ± 45
	1000	5,25	875 ± 35	4,39	78	10 450	11 960 ± 340

ergaben sich je nach Pilz beträchtliche Unterschiede, was auch aus den Aufnahmewerten nachfolgender Pilze deutlich wird (dargestellt: γ Sr/g Trockengewicht):

Aspergillus niger A 7	255 γ/g	30 °C
Aspergillus fumigatus	406 γ/g	30 °C
Aspergillus amstelodami	554 γ/g	30 °C
Penicillium citrinum BB 12	120 γ/g	30 °C
Penicillium patulum	115 γ/g	25 °C
Penicillium corylophilum	160 γ/g	25 °C

Die Werte beziehen sich auf dieselbe Kulturdauer wie in Tabelle 1, auf Anfangskonzentration an Strontium 100 γ/ml und Temperaturbereich für optimales Wachstum der Pilze. Anhand der in Tabelle 1 dargestellten Werte sind noch zwei mit Strontium in Beziehung stehende Effekte hervorzuheben. Einmal förderte Strontium das Wachstum bei folgenden Aspergillusarten: *Aspergillus terreus*, *A. niger A 7*, *A. ustus*, *A. amstelodami* und *A. ruber*. Die Förderung war in jungen Kulturen am grössten (Tab. 4, Kol. 3, S. 15) (optimale Wachstumsbedingungen vorausgesetzt, wie Fe- und Nährsalzkonzentration, Schüttelbedingungen oder Belüftung).

Dann zeigt ein Vergleich (Tab. 1) der allgemeinen Ionenaufnahme (Asche) und der Strontiumaufnahme mit dem Trockengewicht, dass um so mehr Nährsalze bzw. Strontium aufgenommen wurde, je langsamer die Pilze unter den gegebenen Bedingungen gewachsen sind. Hiezu ein weiteres Beispiel: Nährlösung mit einer Strontiumkonzentration von 100 γ/ml wurde mit Sporen von *A. terreus* beimpft und zum Teil als Standkulturen während 3 Tagen (solange das Mycel, wie in Schüttelkulturen, noch untergetaucht wuchs) so angezogen, dass verschieden starke Belüftung[1] Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit erzeugte (Tab. 2). Mit zunehmend verbesserter Belüftung nahm die Wachstumsgeschwindigkeit stark zu, die Ionenaufnahme und speziell die Strontiumaufnahme hingegen wurden dabei deutlich verringert. Eine Wachstumsbeschleunigung im Bereich langsamer Entwicklung der Kulturen setzte die Strontiumaufnahme stärker herab als dieselbe Wachstumszunahme bei rascher wachsenden Kulturen.

Aufgrund dieser Erfahrungen dürfen die beträchtlichen Unterschiede in der Strontiumaufnahme verschiedener Pilze nicht als rein artspezifisch

---

[1] Die zusätzliche Belüftung der Kultur erfolgte mit Pressluft: diese wurde gefiltert, vorgewärmt und befeuchtet und durch ein Kapillarrohr in die Nährlösung geleitet (ca. 50 ml/Minute und Kulturkolben). Das Trockengewicht solcher Kulturen war kleiner als bei den Schüttelkulturen, vielleicht darum, weil auch für diese streng aeroben Pilze die CO_2-Konzentration für das Wachstumsoptimum höher ist als diejenige in atmosphärischer Luft (s.a. Steinberg, 1942; Vakil et al., 1961).

Tabelle 2

Aspergillus terreus: Abhängigkeit der Strontiumaufnahme von der Wachstumsgeschwindigkeit

Versuchsdauer: 3 Tage, Mycel während dieser Zeit in strontiumhaltiger Nährlösung aus Sporen gewachsen

Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: 30 °C

Strontiumkonzentration in der Nährlösung: 100 γ/ml

8 Parallelkulturen

	Trockengewicht mg	Sr pro Kultur γ	Asche/Trockengewicht mg/g	Sr/Trockengewicht γ/g	Sr/Aschegewicht γ/mg
Standkultur: Belüftung durch Diffusion	151 ± 13	218	41,4	1446	35,0
Standkultur: Belüftung mit Pressluft	233 ± 16	127	38,7	543	14,0
Schüttelkultur	750 ± 51	90,2	35,2	120	3,4

interpretiert werden, um so mehr als mit Ausnahme der jeweils optimal gewählten Temperatur alle Pilze denselben nicht immer optimalen Kulturbedingungen ausgesetzt waren. Eher ist ein Gattungsunterschied möglich (Tab. 3), indem im Mittel, bei gleicher Gewichtbildung (0,876 g für Aspergillus- und 0,937 g für Penicilliumarten), *Aspergillus* deutlich mehr Strontium aufnahm als *Penicillium*.

Tabelle 3

Aspergillus und *Penicillium:* Vergleich der Strontiumaufnahme

Gattungsmittelwerte: γ Sr/g Frischgewicht

Versuchsbedingungen siehe Tabelle 1

Gattung	Konzentration an Strontium γ/ml			
	1	10	100	1000
Penicillium	11,5	16,8	39,2	2330
Aspergillus	15,3	24,7	98,0	4580
Erhöhte Sr-Aufnahme von *Aspergillus* in Prozenten	33	47	150	97
Anzahl untersuchter Arten/Gattung	3	3	6	3

Strontiumaufnahme in physiologisch verschiedenen Stadien

Da die Wachstumsgeschwindigkeit einen deutlichen Einfluss auf die Strontiumaufnahme hatte, lag es nahe, die konzentrationsabhängige Aufnahme auch in verschiedenen Wachstumsstadien mit *A. terreus* als Testorganismus zu untersuchen.

Tabelle 4

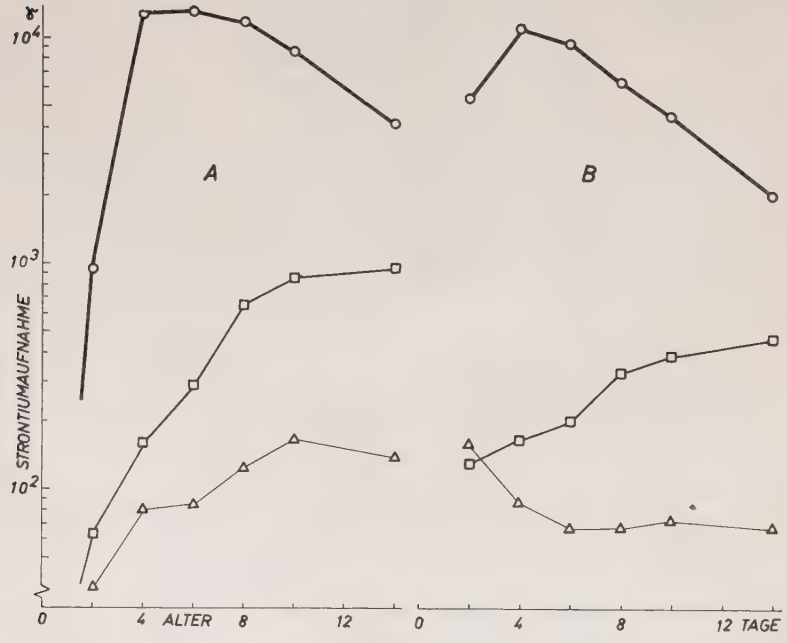
Aspergillus terreus: Zeitliche Abhängigkeit der Strontiumaufnahme
Versuchsbeginn bei Sporenimpfung
Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: 30 °C
6—8 Parallelkulturen pro Bedingung

Tage	Anfangskonzentration an Sr γ/ml	Frischgewicht g	Trockengewicht mg	Wassergehalt g	Asche/Trockengewicht mg/g	Sr/Kultur γ	Sr/Trockengewicht γ/g	K/Trockengewicht mg/g
2	0	0,93	145	0,78	90			12,39
	10	1,48	239	1,24	65	37	155	8,05
	100	2,43	507	1,92	47	64	127	6,76
	1000	1,07	183	0,89	180	935	5 115	11,87
4	0	3,92	884	3,04	40			5,46
	10	3,94	934	3,01	39	80	86	5,25
	100	4,32	980	3,34	36	160	163	4,67
	1000	4,18	962	3,22	80	12 090	12 555	6,18
6	0	5,17	1248	3,92	36			4,70
	10	5,04	1283	3,76	32	85	66	4,40
	100	5,57	1437	4,13	35	284	197	4,55
	1000	5,45	1348	4,10	51	12 330	9 155	4,66
8	0	7,96	1727	6,23	30			4,08
	10	8,11	1827	6,28	30	123	67	4,21
	100	8,61	2078	6,53	31	671	323	3,87
	1000	7,00	1762	5,24	45	10 920	6 200	4,04
10	0	10,10	1984	8,12	31			4,29
	10	10,81	2027	8,78	28	166	82	4,20
	100	9,23	2150	7,08	29	824	383	4,27
	1000	8,47	1962	6,51	37	8 630	4 400	4,12
14	0	9,32	1960	7,36	41			—
	10	9,65	2053	7,60	34	136	66	—
	100	9,52	2030	7,49	38	935	464	—
	1000	10,00	2081	7,19	41	4 105	1 970	—

Vor allem in Schüttelkulturen lassen sich physiologisch verschiedene Stadien dieser Pilze nicht so sauber auseinanderhalten wie bei höheren Versuchspflanzen, wo das Altern nicht allein von den Kulturbedingungen, sondern auch genetisch bedingt ist. Demzufolge konnten hier, neben dem Keimstadium, nur ein Stadium mit vorherrschendem Baustoffwechsel und, bei teilweise erschöpfter Nährlösung, ein solches mit vorwiegendem Betriebsstoffwechsel unterschieden werden.

Nährlösung mit verschiedenen Mengen Strontium wurde mit Sporen von *A. terreus* beimpft. Die Kulturen wuchsen bei 30 °C. Zu verschiedenen Zeiten der Entwicklung wurde jeweils eine Anzahl schon bei Versuchsbeginn bestimmter Kulturen abgebrochen und untersucht.

Im Keimstadium erfolgte die relative (pro Mycelgewicht) Aufnahme bei allen Strontiumkonzentrationen sehr rasch (Tab. 4, Fig. 2). In der wei-



Figur 2

Aspergillus terreus: Zeitliche Abhängigkeit der Strontiumaufnahme
Versuchsbeginn bei Sporenimpfung
Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: 30 °C
6–8 Parallelkulturen pro Konzentration
Strontiumkonzentration in γ/ml: △——△ 10, □——□ 100, ○——○ 1000
A: pro Kultur (γ) B: pro Trockengewicht (γ/g)

teren Entwicklung unterschied sich jedoch die Aufnahme bei verschiedener Strontiumkonzentration in der Nährlösung sehr deutlich.

Bei 10 γ Sr/ml stieg die absolute Aufnahme bis zum 10. Kulturtag an, doch nahm der Strontiumgehalt vom 2. bis zum 4. Tag infolge des starken Wachstums sehr rasch ab. Später hielten sich die Aufnahme und der Mycelzuwachs die Waage, das heisst, der Strontiumgehalt blieb konstant.

Bei 100 γ Sr/ml stieg auch die relative Aufnahme stetig an, so dass auch nach längerer Kulturzeit immer noch mehr Strontium aufgenommen wurde, als es dem Mycelzuwachs entsprach. (Der im Vergleich zu 10 γ Sr/ml geringere Strontiumgehalt am zweiten Kulturtag dürfte durch das in diesem Zeitpunkt und bei dieser Konzentration stark geförderte Wachstum und die damit verbundene Herabsetzung der Ionenaufnahme bedingt sein.)

Bei einer Strontiumkonzentration in der Nährlösung von 1000 γ Sr/ml wurde in der Wachstumsphase sehr viel Strontium aufgenommen. Nach

Tabelle 5

Aspergillus terreus: Strontiumaufnahme in wachsenden bzw. nichtwachsenden Kulturen

Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: 30 °C

6–8 Parallelkulturen pro Konzentration

A: Wachsende Kulturen:

Versuchsdauer: 6 Tage, Mycel während dieser Zeit in strontiumhaltiger Nährlösung gewachsen

B: Nichtwachsende Kulturen:

Vorkultur: 6 Tage, Mycel aus Sporen in strontiumfreier Nährlösung gewachsen

Zwischenkultur: 1 Tag (s. S. 25), in Nährlösung ohne Stickstoff und Strontium

Versuchsdauer: 2 Tage, in stickstofffreier Nährlösung mit Strontium

F: Aufnahmefaktor bei zehnfacher Erhöhung der Aussenkonzentration an Strontium

	Anfangskonzentration γ Sr/ml	Frischgewicht g	Trockengewicht mg	Asche/Trockengewicht mg/g	Sr/Kultur γ	F	Sr/Trockengewicht γ/g	F	Sr/Frischgewicht γ/g
A:	0	5,17	1248	36	—		—		—
	1	5,29	1334	34	46	1,84	29	2,28	7,7
	10	5,04	1283	34	85	3,21	66	2,98	16,1
	100	5,57	1437	35	284	43,4	197	46,5	50,1
	1000	5,45	1348	51	12 330		9155		2260
B:	0	11,48	1813	44	—		—		—
	1	9,74	1784	45	48	5,94	27	6,25	4,92
	10	9,59	1684	46	285	3,89	169	3,84	29,7
	100	9,27	1704	44	1 108	2,44	650	2,12	120
	1000	10,82	1996	46	2 740		1375		253

6 Tagen jedoch wurde Strontium wieder in die Kulturlösung abgegeben (Tab. 4, absolute Aufnahme).

Beim Vergleich der konzentrationsabhängigen, relativen Aufnahme in zeitlicher Folge fällt auf (Tab. 4), dass die Gesetzmässigkeit der Aufnahme zur Zeit des grössten Wachstums bzw. bei mehrheitlichem Betriebsstoffwechsel grundsätzlich verschieden ist. In der Wachstumsphase steigt die relative Aufnahme bei niederen Strontiumdosierungen in der Nährlösung erst langsam, dann mit zunehmender Aussenkonzentration immer rascher an (teilweise einer Exponentialfunktion mit ganzzahligem Exponenten folgend). Bei vorwiegendem Betriebsstoffwechsel hingegen steigt die Kurve der Aufnahme im Bereich niederer Dosierungen rasch an und verflacht sich, je höher die Aussenkonzentration an Strontium (teilweise einer Exponentialfunktion mit Exponenten < 1 folgend). Zwischen diesen Extremen finden sich in zeitlicher Folge alle Übergänge. Diese Gesetzmässigkeit wird noch besser in Tabelle 5 erkennbar, wo die Aufnahme im vorwiegenden *Baustoffwechsel* mit derjenigen im reinen *Betriebsstoffwechsel* gegenübergestellt wird. Aus derselben Tabelle geht weiterhin hervor, dass aus niederer Strontiumkonzentration in der Nährlösung das Mycel im Betriebsstoffwechsel innert 48 Stunden mehr Strontium aufnimmt als während 6 Tagen in der Entwicklung.

Einfluss von Kalium auf die Strontiumaufnahme

Arbeiten mit höheren Pflanzen ist zu entnehmen, dass Kalium die Aufnahme von Strontium zum Teil wesentlich beeinflussen kann (Ehrler et al., 1955; Klechkovsky, 1957; Libby, 1958), was auch für *A. terreus* zutrifft, wie nachfolgender Versuch zeigt.

Vorerst wurde untersucht, in welchem Konzentrationsbereich von Kalium das Mycelwachstum praktisch unverändert blieb, weil durch unterschiedlich starkes Wachstum die Strontiumaufnahme stark beeinflusst wird. Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, blieb das Mycelwachstum noch konstant, wenn die normal verwendete Kaliummenge in der Nährlösung um das Zehnfache herauf- oder herabgesetzt wurde. (Zusatz als KCl; bei herabgesetzten K-Gaben wurde fehlendes Phosphat durch primäres und sekundäres Ammoniumphosphat und entsprechend weniger Ammoniumnitrat ersetzt.) Auch die Kaliumaufnahme zeigte verhältnismässig geringe Abweichungen, was auch aus hier nicht dargestellten Versuchen hervorging, wo Mycel in stark konzentrierter bzw. stark verdünnter Nährsalzlösung wuchs. Die Strontiumaufnahme hingegen wurde durch erhöhte Kaliumgaben deutlich herabgesetzt, am stärksten bei hoher Strontiumkonzentration in der Nährlösung.

Tabelle 6

Aspergillus terreus: Wirkung des Kaliums auf die Strontiumaufnahme

Versuchsdauer: 6 Tage, Mycel während dieser Zeit in strontiumhaltiger Nährlösung aus Sporen gewachsen

(Normal verwendete Kaliumkonzentration: 0,339 g K/l)

Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: 30 °C

8 Parallelkulturen pro Konzentration

Kaliumkonzentration in g/l			Konzentration an Sr γ/ml				
			0	1	10	100	1000
0,0339	Trockengewicht	mg	1559	1523	1523	1629	1 700
	Aschegehalt	mg/g	34	30	34	33	54
	K/Trockengewicht	mg/g	2,2	2,52	2,53	2,27	2,54
	Sr/Kultur	γ		59,5	77,8	266	27 200
	Sr/Trockengewicht	γ/g		38,5	51,2	164	15 980
3,39	Trockengewicht	mg	1580	1585	1614	1713	1 546
	Aschegehalt	mg/g	27	31	31	30	51
	K/Trockengewicht	mg/g	3,41	3,68	3,68	3,51	4,5
	Sr/Kultur	γ		32,5	53,8	170	9 080
	Sr/Trockengewicht	γ/g		20,5	33,3	99,4	5 870

Umgekehrt liess sich in bezug auf die Kaliumaufnahme kein wesentlicher Antagonismus erkennen. Eine Hemmung der Kaliumaufnahme durch niedere Strontiumkonzentration liess sich am deutlichsten im Keimstadium erkennen (Tab. 4) oder aber in älteren Kulturen, welche in stark verdünnter Nährsalzlösung wuchsen. Hohe Strontiumkonzentrationen förderten die Kaliumaufnahme, aber wiederum vorwiegend in jungen Kulturen (Tab. 4). Soweit untersucht, stehen diese Resultate im Gegensatz zu dem, was für höhere Pflanzen gefunden worden ist (Olsen, 1948; Viets, 1944; Jacobson et al., 1960).

Einfluss von Calcium auf die Strontiumaufnahme

Für höhere Pflanzen ist bekannt, dass unter gewissen Bedingungen Calciumionen die Strontiumaufnahme hemmen (Collander, 1941; Menzel und Held, 1955; Klechkovsky, 1957; Russell und Squire, 1958; für weitere Literaturangaben s. auch Läuchli, 1962). Solche Untersuchungen sind für die in dieser Arbeit verwendeten Pilze einfacher durchzuführen, da für diese Organismen keine physiologisch wichtige Funktion des Calciums bekannt ist und darum das Strontium-Calcium-Verhältnis in der Nährlösung beliebig variiert werden kann.

In einer Nährlösung mit der Strontiumkonzentration 100 γ/ml wurde das Strontium schrittweise durch äquivalente Mengen Calcium (als $CaCl_2$) ersetzt. Die Summe der Ionen von Calcium und Strontium blieb daher konstant gleich $228 \cdot 10^{-5}$ mv (Milliäquivalent)/ml Nährlösung. Je 8 Parallelkulturen hatten folgendes Strontium-Calcium-Ionenverhältnis:

Sr	100	99	90	50	10	1	0
Ca	0	1	10	50	90	99	100

Zum Vergleich wurde die Strontium- und Calciumaufnahme allein, ohne gegenseitige Beeinträchtigung, ebenfalls während 6 Tagen und bei optimaler Wachstumstemperatur untersucht.

Es wurde im Rahmen der experimentellen Möglichkeit versucht, die Nährlösung und Kultur frei von Calciumverunreinigungen zu halten. So wurde Ionenaustauscherwasser vom spez. Widerstand von $10–11 \cdot 10^6$ Ohm sowohl zur Reinigung der Kulturgefässe als auch zur Herstellung der Nährlösung verwendet. Die Sporen der Sporensuspension wurden dreimal abzentrifugiert und jedesmal wieder mit reinstem Wasser aufgenommen. Die Sporendichte jedoch wurde wegen der von ihr abhängigen Wachstumsgeschwindigkeit nicht verändert. Die Sporen selber wurden von nicht calciumfreien Kulturen auf Malzextraktagar (Treschow, 1944) abgeerntet. (Nach Angaben von Aso [1900] und Rennerfelt [1934] soll, im Gegensatz zu anderen Kationen, der Gehalt an Calcium in den Sporen wesentlich geringer sein als derjenige im Mycel.) Von den Analysensubstanzen fallen mengenmässig NH_4NO_3 und Glukose als Calciumlieferanten in Betracht. Alle diese Calciumquellen wurden berücksichtigt, indem Nährlösung verascht und der Calciumgehalt bestimmt wurde. Das Mittel dieser gefundenen Werte von Calciumverunreinigungen (s. Tab. 8) wurde zu den zugefügten niederen Calciummengen addiert und die Aufnahme nicht auf die zugesetzte, sondern auf die reelle Calciumkonzentration bezogen.

Ein Vergleich der Aufnahme von Strontium aus Nährlösung ohne Calciumzusatz mit derjenigen von Calcium ohne Strontium (Tab. 7) zeigt, dass aus niederen Aussenkonzentrationen wesentlich mehr Calcium als Strontium und umgekehrt bei hohen Aussenkonzentrationen mehr Strontium als Calcium aufgenommen wurde. Diese grosse Aufnahme von Calcium aus niederen Aussenkonzentrationen liess sich auch bei gleichzeitiger Anwesenheit und Aufnahme von Strontium feststellen (Fig. 3, Tab. 8). In ihrer Aufnahme haben sich die beiden Ionen gegenseitig gehemmt, wobei diese Hemmung für beide bei annähernd demselben Ionenverhältnis in der Nährlösung eintrat und mit steigender Aussenkonzentration des an der Aufnahme gehemmten Ions und mit sinkender Konzentration des Hemmions zunahm. Soll daher die Strontiumaufnahme gehemmt werden, so spielt innerhalb gewisser Grenzen die Konzentration des Hemmions (Ca) keine Rolle, wohl aber diejenige des zu hemmenden Ions (Sr). Eine Förderung der Calciumaufnahme aus niederer Calcium- und hoher Strontiumkonzentration ist möglich, jedoch nur bei einem der untersuchten Ionenverhältnisse signifikant.

Tabelle 7

Aspergillus terreus: Vergleich der Aufnahme von Calcium mit derjenigen von Strontium in Parallelversuchen

Mycel während 6 Tagen in strontium- bzw. calciumhaltiger Nährlösung aus Sporen gewachsen

Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: 30 °C

Calcium als $CaCl_2$ zugesetzt

Je 8 Parallelkulturen pro Sr- bzw. Ca-Konzentration

Konzentration an Sr^{++} 10^{-5} mv/ml		2,28 (= 1 γ/ml)	22,8 (= 10 γ/ml)	114 (= 50 γ/ml)	205,2 (= 90 γ/ml)	228 (= 100 γ/ml)	2280 (= 1000 γ/ml)
Frischgewicht g Sr-Kultur		6,39	6,43	7,26	7,28	7,59	6,12
Trockengewicht mg Sr-Kultur		1106	1295	1284	1342	1398	1359
Sr^{++}-Aufnahme pro Trockengewicht in 10^{-5} mv/g		66	126	262	372	435	11 400
Konzentration an Ca^{++} 10^{-5} mv/ml	0,41[1]	2,28 + 0,41[1]	22,8	114	205,2	228	2280
Frischgewicht g Ca-Kultur	7,14	7,52	7,32	6,21	6,62	7,14	5,47
Trockengewicht mg Ca-Kultur	1,109	1149	1213	1311	1325	1209	1197
Ca^{++}-Aufnahme pro Trockengewicht in 10^{-5} mv/g	43	231	296	312	353	395	1710
Gegenüber Sr geänderte Ca-Aufnahme in Prozenten 100 % = Sr-Aufnahme		350	235	119	94,6	90,8	15

[1] Calcium als Verunreinigung in der Nährlösung

Es ist zu beachten, dass der Pilz das in der Nährlösung ursprünglich vorgegebene Verhältnis an Strontium/Calcium bzw. Calcium/Strontium von maximal ca. 50000 durch die Aufnahmetätigkeit auf ca. 1000000 erweitern, in den Zellen aber auf ca. 80 herabsetzen kann (Tab. 9). Dieser Ausgleich der Ionenverhältnisse im Mycel beruht unter anderem darauf,

Tabelle 8

Aspergillus terreus: Wirkung des Calciums auf die Strontium- und des Strontiums auf die Calciumaufnahme

Versuchsdauer: 6 Tage, Mycel während dieser Zeit in strontium- und calciumhaltiger Nährlösung aus Sporen gewachsen

Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: 30 °C

Calcium als $CaCl_2$ zugesetzt

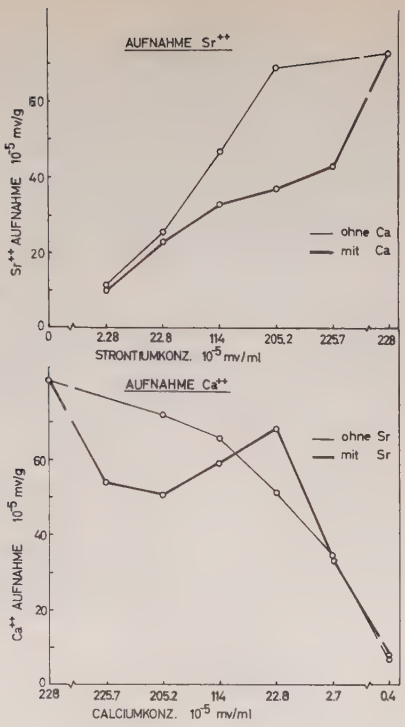
Summe der Ionen $Ca^{++}+Sr^{++}=228\cdot10^{-5}$ mv/ml (entspricht 100 γ Sr/ml)

8 Parallelkulturen pro Konzentration

Konzentration Sr in Nährlösung Ca 10^{-5}mv/ml	0 — 0,4[1]	0 228	2,3 225,7	22,8 205,2	114 114	205,2 22,8	225,7 2,3 0,4[1]	228 0,4[1]
Frischgewicht g	7,14	6,91	6,79	7,07	6,91	6,94	7,79	7,59
Trockengewicht mg	1209	1352	1390	1219	1265	1277	1359	1398
Wassergehalt g	5,93	5,56	5,40	5,85	5,64	5,66	6,43	6,19
Asche/Trockengewicht mg/g	37,5 ± 1	35,5 ± 1	33,3 ± 0,6	42,0 ± 1	38,3 ± 0,4	41,1 ± 0,8	36,3 ± 1,1	36,3 ± 0,4
K/Trockengewicht 10^{-5}mv/g	14 200	13 500	12 000	15 100	15 900	16 600	13 400	14 100
Sr/Kultur 10^{-5}mv	—	—	60,2	127,4	228	261	359	606
Ca/Kultur 10^{-5}mv	52	536	358	288	413	499	285	54
Relative Sr-Aufnahme ohne Ca 10^{-5}mv/g	—	—	66	126	262	372	(435)[2]	435
Relative Sr-Aufnahme mit Ca 10^{-5}mv/g	—	—	45	109	148	208	259	435
Relative Ca-Aufnahme mit Sr 10^{-5}mv/g	43	395	273	241	318	400	206	39,8
Relative Ca-Aufnahme ohne Sr 10^{-5}mv/g	43	395	(395)[2]	353	312	296	231	43
Σ (Sr-Aufnahme ohne Ca und Ca-Aufnahme ohne Sr) theoretisch		395	461	479	574	668	666	478
Σ (Sr-Aufnahme mit Ca und Ca-Aufnahme mit Sr) experimentell		395	318	350	466	608	465	475

[1] Zu berücksichtigende Ca-Verunreinigung in der Nährlösung

[2] Werte nicht bestimmt, da Konzentration in der Nährlösung praktisch gleich der nächsthöheren



Figur 3

Aspergillus terreus: Wirkung des Calciums auf die Strontium- und des Strontiums auf die Calciumaufnahme

Versuchsdauer: 6 Tage, Mycel während dieser Zeit in strontium- und calciumhaltiger Nährlösung aus Sporen gewachsen

Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: 30 °C

Calcium als $CaCl_2$ zugesetzt

8 Parallelkulturen pro Konzentration

Aufnahme Ca++ bzw. Sr++/g Frischgewicht

dass einerseits Strontium und besonders Calcium aus niederen Aussenkonzentrationen stark akkumuliert und durch das Gegenion in der Aufnahme nicht gehemmt wurde, andererseits die Aufnahme aus hohen Aussenkonzentrationen relativ gering war und durch das Gegenion gehemmt wurde.

Die Quotienten aus den Strontium-Calcium-Verhältniszahlen im Mycel und in der Kulturlösung, logarithmisch gegen das ursprüngliche Verhältnis in der Nährlösung aufgetragen, liegen auf einer Geraden. Anhand dieser lässt sich berechnen oder ablesen, welches Ionenverhältnis in der Zelle optimal ist, bzw. welches Ionenverhältnis in der Nährlösung vorliegen

Tabelle 9

Aspergillus terreus: Vergleich der Strontium-Calcium-Ionenverhältnisse in Mycel und Nährlösung, anfangs und am Schluss

Versuchsdauer: 6 Tage, Mycel während dieser Zeit in strontium- und calciumhaltiger Nährlösung aus Sporen gewachsen

Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: 30 °C

Calcium als $CaCl_2$ zugesetzt

8 Parallelkulturen pro Konzentration

Strontium-Calcium-Ionenverhältnis in			Quotient Sr/Ca im Mycel / Sr/Ca in Kulturlösung
Nährlösung[1] (anfangs)	Mycel	Nährlösung (am Ende des Versuches)	
0,01	0,170	0,0083	20,6
0,11	0,445	0,108	4,14
1,0	0,552	1,01	0,504
9,0	0,524	10,4	0,0504
83,5	1,265	284	0,0045
570	11,35	9450	0,0012

[1] Die Verunreinigung durch Ca^{++} ist in diesen Werten berücksichtigt

muss, damit die Ionen im gleichen Verhältnis vom Pilz aufgenommen werden. Diese Bedingung ist erfüllt, wenn die Ionen von Strontium und Calcium im Verhältnis von 1:2 (berechnet 0,52) in der Nährlösung vorhanden sind. Dieselbe Gesetzmässigkeit liess sich auch in jüngeren Kulturen feststellen. Es ist nun zu beachten, dass der untersuchte Pilz einerseits dieses Ionenverhältnis im Mycel über einen breiten Bereich von Verhältniswerten in der Aussenlösung annähernd aufrecht hält (Tab. 9, Ionenverhältnis im Mycel) und andererseits signifikante Hemmung der Aufnahme von Calcium- bzw. Strontiumionen aus hoher Aussenkonzentration beidseits dieses «idealen» Ionenverhältnisses auftritt (Fig. 3). Es wird daher bei abweichendem Ionenverhältnis in der Nährlösung das in seiner Zahl zu stark auftretende Ion in der Aufnahme gehemmt, die Aufnahme des anderen, in zu geringer Zahl vorkommenden Ions nicht gehemmt oder gefördert. Ob dieses Ionenverhältnis von 0,52 mit dem reziproken Wert des Verhältnisses ihrer Atomgewichte (0,46) in Beziehung steht, soll hier nicht beurteilt werden.

Es ist klar, dass die addierten Werte der getrennt untersuchten Strontium- bzw. Calciumaufnahme (theoretische Summe) stets höher liegen als diejenigen bei gemeinsamer Aufnahme (Tab. 8). Die Maxima beider Summenaufnahmen liegen bei demselben Strontium-Calcium-Verhältnis von 9:1, weil auch in Anwesenheit von Strontium aus niederer Calciumkonzentration viel Calcium aufgenommen wird.

Wirkung der Temperatur auf die Strontiumaufnahme

Temperatur und Kohlenstoffquelle sind Faktoren, die, im Gegensatz zu höheren Pflanzen, in Versuchen mit Pilzen leicht variiert werden können. Da aber das Wachstum des Mycels stark abhängig ist von der Temperatur und von der Glukosekonzentration und die Wachstumsrate ihrerseits die Strontiumaufnahme beeinflusst, wurde letztere unter Bedingungen, welche nur Betriebsstoffwechsel erlauben, untersucht.

Aspergillus terreus wurde in normaler Nährlösung (ohne Strontium) während 6 Tagen bei 30 °C kultiviert. Unter aseptischen Bedingungen wurde die Kulturlösung vom Mycel abgetrennt und durch viermaliges Spülen mit reinem, sterilem Wasser die Mycelkörner restlos von der Kulturlösung befreit. Da aber solche Pilze noch Stickstoffreserven besitzen, welche ein weiteres Wachstum gestatten, wurden die Kulturen nach Zusatz stickstofffreier Nährlösung bei 30 °C während 24 Stunden weitergeschüttelt. Nach dieser Zwischenkultur wurde wiederum unter aseptischen Bedingungen abgenutscht und dem Mycel stickstofffreie Nährlösung mit 4 %, 1 % bzw. 0,4 % Glukose zugesetzt und die Aufnahme bei Temperaturen von 20, 30 und 40 °C untersucht. Nach der oben erwähnten Zwischenkultur konnte während der Versuchsdauer von 48 Stunden kein Wachstum der Kulturen mehr festgestellt werden.

Tabelle 10

Aspergillus terreus: Strontiumaufnahme (γ/g Trockengewicht) in Abhängigkeit von der Temperatur (in nichtwachsenden Kulturen, nur Betriebsstoffwechsel)
Vorkultur: 6 Tage, Kulturen in Nährlösung ohne Strontium aus Sporen gewachsen
Zwischenkultur: 1 Tag, Mycel in Nährlösung ohne Strontium und ohne Stickstoff
Versuchsdauer: 2 Tage, Mycel in Nährlösung mit Strontium und ohne Stickstoff: Betriebsstoffwechsel

Glukose-konzentration	Temperatur °C	Strontiumaufnahme in γ/g Trockengewicht bei Strontiumkonzentration in γ/ml			
		1	10	100	1000
4 %	20	21,0	110	524	1326
	30	27,1	169	650	1375
	40	29,6	185	756	2070

Die Aufnahme von Strontium nimmt mit steigender Versuchstemperatur zu (Tab. 10). Wird die Temperatur um 10 °C von 20 °C auf 30 °C erhöht, so ist die Förderung der Aufnahme grösser als bei derselben Temperaturerhöhung von 30 °C auf 40 °C (ausgenommen bei einer Strontiumgabe von 1000 γ/ml), weil damit auch bei einem thermophilen Organismus

wie *Aspergillus terreus* die obere Grenze des optimalen Temperaturbereiches erreicht ist. Die Förderung der Strontiumaufnahme durch Temperaturerhöhung, die bei niederer Glukosekonzentration (Tab. 14) noch deutlicher zum Ausdruck kommt, konnte auch für höhere Pflanzen von Jacobson und Overstreet (1947) für die Strontiumaufnahme und von Zhurbitzky und Shtrausberg (1958) für die Calciumaufnahme nachgewiesen werden.

Zum Mechanismus der Strontiumaufnahme

Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pilze die Strontiumionen nicht nur passiv durch Diffusion, sondern auch aktiv, unter Energieaufwand der Zelle, aufnehmen.

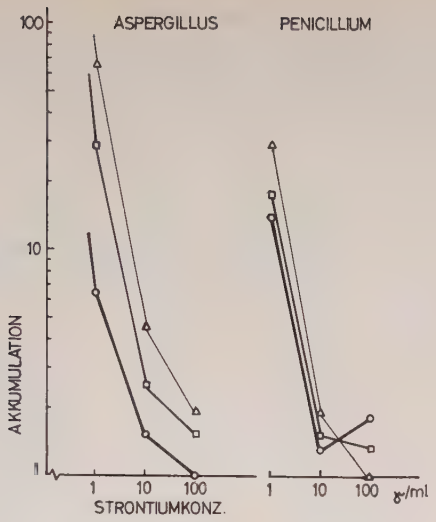
Tabelle 11

Aspergillus: Strontiumaufnahme in Prozent der gebotenen Menge
Mycel während 6 Tagen in strontiumhaltiger Nährlösung aus Sporen gewachsen
Kultivierung im optimalen Temperaturbereich für Wachstum
9–12 Parallelkulturen pro Konzentration
Für weitere Daten siehe Tabelle 1

Prozent aufgenommen durch:	Anfänglicher Sr-Gehalt der Nährlösung (γ/150 ml)		
	150	1500	15 000
Aspergillus terreus	21,3	4,8	2,1
Aspergillus clavatus	51,3	8,2	4,4
Aspergillus ustus	61,5	9,4	4,0

So nahmen die untersuchten Pilze aus Nährlösung mit niederen Konzentrationen an Strontium beträchtliche Mengen dieses Ions auf, oft über 50% (Tab. 11). Bezieht man die Menge an aufgenommenem Strontium auf das Mycelvolumen, was allerdings nur sinnvoll ist bei der Annahme, Strontium liege in den Zellen grösstenteils frei vor (s. hiezu Robertson, 1958), so ergab sich die «Konzentration» im Mycel beträchtlich grösser als die Anfangs- oder Endkonzentration in der Aussenlösung (Fig. 4).

Zur Berechnung der Strontiumkonzentration im Mycel wurde dessen Frischgewicht in g gleich dem Mycelvolumen in ml gesetzt. In der vorliegenden Arbeit bedeutet Akkumulation, dass die «Konzentration» der Strontiumionen im Mycel grösser ist als in der Aussenlösung (s.a. Robertson, 1958). Demnach liegt Akkumulation vor, wenn das Konzentrationsverhältnis Mycel/Aussenlösung grösser 1 ist.



Figur 4

Aspergillus und *Penicillium:* Akkumulation von Strontium im Mycel
Mycel während 6 Tagen in strontiumhaltiger Nährlösung aus Sporen gewachsen
Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: siehe Tabelle 1
9–12 Parallelkulturen pro Konzentration

$$\text{Akkumulation} = \frac{\text{«Konzentration» an Sr im Mycel}}{\text{Endkonzentration an Sr in Kulturlösung}}$$

Aspergillus terreus ○——○ *Penicillium citrinum* 806
Aspergillus clavatus □——□ *Penicillium frequentans*
Aspergillus ustus △——△ *Penicillium expansum*

Die Akkumulation von Strontium nimmt mit steigender Aussenkonzentration ab. Ähnliches gilt auch für andere Ionen (Tab. 12). Doch werden Kalium oder auch die Nährionen unter Berücksichtigung der vorgegebenen Konzentration gesamthaft bedeutend stärker akkumuliert als Calcium oder Strontium, welche als Ballastelemente anzusehen sind, da ihnen offenbar für die untersuchten Organismen keine lebenswichtige Funktion zukommt. Im Vergleich zu Strontium ist jedoch die Anhäufung von Calcium im Mycel im Bereich niederer Dosierungen grösser, vor allem dann, wenn nicht das Gewicht, sondern die Zahl der Ionen berücksichtigt wird (s. auch Tab. 7).

Aus Tabelle 12 geht weiter hervor, dass bei hoher Ionenkonzentration in der Nährlösung diese Ionen ausgeschlossen werden können, für Strontium allerdings nur in schwach oder nicht wachsenden Kulturen. So liegen

Tabelle 12

Aspergillus terreus: Akkumulation von Ionen im Mycel

Ionenaufnahme während 6 Tagen, Mycel in dieser Zeit aus Sporen gewachsen

$$\text{Akkumulation} = \frac{\text{«Konzentration» der Ionen im Mycel}}{\text{Endkonzentration der Ionen in Kulturlösung}}$$

	Anfangs-konzentration in Nährlösung γ/ml (vorgegeben)	End-konzentration in Kulturlösung γ/ml (berechnet)	«Konzentration» im Mycel γ/ml (bestimmt)	Akkumulation
Nährionen, total	315	79,5	5420	68,2
	3 150	3 010	9300	3,1
	31 500	33 600	6950	0,21
Kaliumionen	33,9	11,4	670	58,9
	339	316	860	2,76
	3 390	3 530	1000	0,28
Calciumionen	0,455	0,105	7,12	68,0
	4,55	4,33	9,85	2,28
	45,5	47,5	13,4	0,28
	455	482	74,9	0,16
Strontiumionen	1	0,747	5,01	6,70
	10	9,97	11,1	1,50
	100	104,3	35,2	0,338
	1 000	1 010	1110	1,1
				(0.25)[1]

[1] Aufnahme im reinen Betriebsstoffwechsel

(Es ist zu erwähnen, dass andere, langsamwachsende Pilze diese Ionen wesentlich stärker anhäufen)

während der Entwicklung einer Kultur von *A. terreus* bei 1000 γ Sr/ml Nährlösung, nach Versuchsdauer in Tagen:

2 4 6 8 10 14

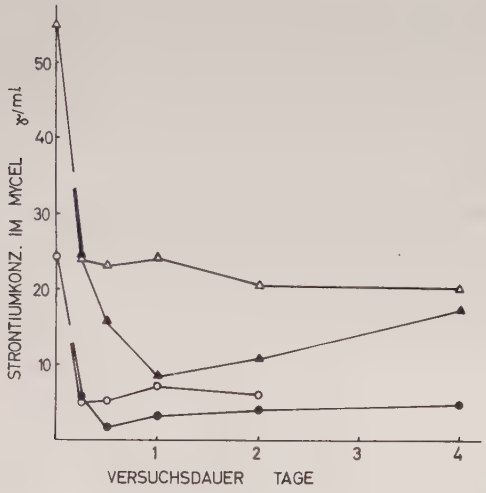
folgende Akkumulationswerte von Strontium vor:

0,87 3,05 2,38 1,60 1,02 0,39

Diese Abnahme ist bedingt einerseits durch Mycelzuwachs, andererseits aber auch durch Austritt von Strontium aus dem Mycel (s. Tab. 4 und Fig. 2: absolute Aufnahme).

Bei der Berechnung der Akkumulationswerte wurde angenommen, aufgenommenes Strontium liege in der Zelle hauptsächlich frei vor. Dafür

spricht folgender Versuch: Mycel wuchs während 2 bzw. 6 Tagen in strontiumhaltiger Nährlösung und wurde nach sorgfältiger Abtrennung dieser Lösung in stickstofffreie Nährlösung *ohne* Strontium übertragen und die in die Kulturlösung abgegebene Menge Strontium bestimmt.



Figur 5

Aspergillus terreus: Strontiumabgabe aus dem Mycel

Mycel 2 bzw. 6 Tage in strontiumhaltiger Nährlösung (100 γ Sr/ml) aus Sporen gewachsen, anschliessend in strontium- und stickstofffreie Nährlösung übertragen

Im Mycel verbleibendes Strontium auf das Frischgewicht der Kulturen bezogen

Ausgefüllte Signaturen: Calciumzusatz ($CaCl_2$) in die strontiumfreie Nährlösung ($228 \cdot 10^{-5}$ mv/ml)

3–5 Parallelkulturen pro Konzentration

△ Mycel 6 Tage alt: △——△ Abgabe ohne Ca, ▲——▲ mit Ca

○ Mycel 2 Tage alt: ○——○ Abgabe ohne Ca, ●——● mit Ca

Das aufgenommene Strontium wurde mehrheitlich und rasch aus dem Mycel in die Aussenlösung abgegeben: verglichen mit der ursprünglich pro Kultur aufgenommenen Menge mindestens 70 % in jungen und 56 % in älteren Kulturen (Fig. 5). Der grössere Teil des Strontiums im Mycel dürfte daher nicht oder nur locker gebunden sein. Die Akkumulationswerte, berechnet aus dem dann noch im Mycel verbleibenden Strontium und dem in die Kulturlösung abgegebenen Anteil, sind mit 20 für junge und 16,4 für ältere Kulturen immer noch sehr hoch, doch findet auch nach längerer Zeit keine Abgabe mehr statt. Bei Zusatz von Calcium in die strontiumfreie Nährlösung wird jedoch wesentlich mehr Strontium an

diese abgegeben (93 % in jungen bzw. 79 % in älteren Kulturen), wobei die durch Calciumzusatz bedingte vermehrte Abgabe langsam vor sich geht. Dies lässt einen Austausch von Strontium gegen Calcium vermuten. Prozentual verglichen, geben junge Hyphen mehr Strontium ab als ältere, jedoch ist der durch Calcium verdrängbare Anteil ungefähr gleich gross.

Aus den bisherigen Resultaten geht hervor, dass eine Aufnahme nur durch reine Diffusion unwahrscheinlich ist. Es stellt sich daher die Frage, ob die Aufnahme teilweise auch mit dem Energiehaushalt der Zelle verknüpft ist.

Tabelle 13

Aspergillus terreus: Abhängigkeit der Strontiumaufnahme von der Atmung

Vorkultur: 4 Tage, Mycel während dieser Zeit in Nährlösung ohne Strontium aus Sporen gewachsen

Versuchsdauer: 3 Tage, Mycel in stickstofffreier Nährlösung mit 100 γ Sr/ml, mehrheitlich Betriebsstoffwechsel

Optimaler Temperaturbereich für Wachstum: 30 °C

6 Parallelkulturen pro Konzentration

Aschegehalt des Trockenmycels bei Versuchsbeginn: 36 mg/g

Versuchsbedingungen in den Schüttelkulturen	Sr/Trockengewicht γ/g	Asche/Trockengewicht mg/g	Sr/Aschegewicht γ/mg	Akkumulation[1]
Atmungshemmung durch KCN (m/500)	753	22,7	33,2	1,7
Sauerstoffverminderung durch Pyrogallol	1850	52,3	35,5	3,58
Normal	3120	63,6	48,2	6,24

[1] Siehe Tabelle 12

Eine Hemmung der Respiration durch Atmungsgifte wie KCN, in einer Konzentration von 1/500 ml, hemmte auch die Aufnahme von Strontium; die Anhäufung dieser Ionen in der Zelle ist nur gering (Tab. 13). Vielleicht liegt ein Austausch von Nährionen gegen Strontiumionen vor, da Nährionen vom Mycel in die Aussenlösung abgegeben werden. Wird der Sauerstoff durch Pyrogallol teilweise aus dem Kulturraum entfernt[1], so ist auch hier die Aufnahme und Akkumulation von Strontium geringer als in normalen Schüttelkulturen.

[1] Verringerung der Sauerstofftension im Kulturkolben mit Pyrogallol in Lösung von Na-Bikarbonat (Janke, S. 166, 1946): ein steriles Kulturröhrchen mit Absorberlösung wurde in den Kulturkolben eingeführt und dieser luftdicht verschlossen. Filterstreifen im Röhrchen vergrösserten die Sauerstoff absorbierende Oberfläche.

Im untersuchten Bereich bewirkte die Konzentration an Atmungssubstrat (4% bis 0,4%) in stickstofffreier Nährlösung nur einen geringen Einfluss auf die Strontiumaufnahme nichtwachsender Kulturen. (Durchführung der Versuche wie diejenigen über die temperaturabhängige Strontiumaufnahme s. S. 25). Wohl auch darum, weil der Zuckerabbau durch den Pilz je nach der vorliegenden Glukosekonzentration in der Nährlösung auch qualitativ verschieden sein dürfte. Dafür spricht auch die verschieden starke Säurebildung (potentielle Wasserstoffionenkonzentration in der Kulturlösung). Eine Herabsetzung der Glukosekonzentration bewirkt bei niederer Strontiumkonzentration in der Nährlösung eine Hemmung der Strontiumaufnahme, besonders bei tiefer Versuchstemperatur (Tab. 14). In Nährlösung mit höherer Strontiumkonzentration, wo auch bei normaler Glukosekonzentration die Akkumulation nicht mehr gross ist, wird mehr Strontium aufgenommen, wenn der Kultur weniger Zucker zur Verfügung steht. Dies spricht wiederum für einen durch die Glukosekonzentration qualitativ veränderten Betriebsstoffwechsel.

Tabelle 14

Aspergillus terreus: Wirkung der Glukosekonzentration auf die Strontiumaufnahme (γ/g Trockengewicht)

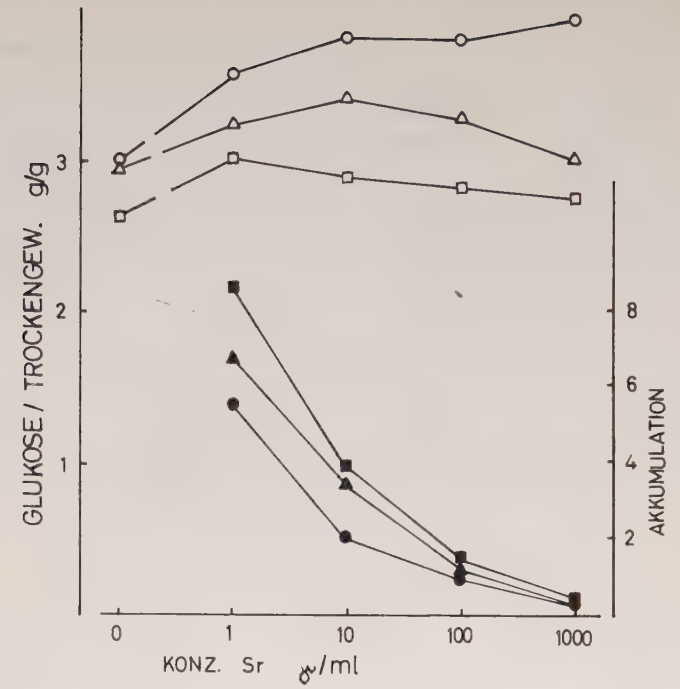
Aufnahme in nicht wachsenden Kulturen während 48 Stunden

Kulturbedingungen wie Tabelle 11

Sr-Konzentration in Nährlösung γ/ml	Versuchstemperatur			
	20 °C Glukose in Nährlösung		30 °C Glukose in Nährlösung	
	4%	0,4%	4%	0,4%
1	21	13	27,1	15,2
10	110	106	169	431
100	524	1476	650	1971

Hingegen konnte anhand des Glukoseverbrauches eine deutlichere Beziehung zwischen Atmungssubstrat und Strontiumaufnahme nachgewiesen werden. Kulturen, die in strontiumhaltiger Nährlösung mit 4% Glukose geschüttelt wurden, verbrauchten mehr Glukose als strontiumfreie Kulturen[1] (Fig. 6). Je tiefer die Versuchstemperatur, desto grösser war der durch Strontium bedingte Mehrverbrauch an Glukose (maximal 20%). Während bei höheren Versuchstemperaturen der Mehrverbrauch an Glu-

[1] Zuckerbestimmung in der Kulturlösung nach der von Nelson (1944) ausgearbeiteten Methode. Kolorimetrische Bestimmung mit Spektrophotometer.



Figur 6

Aspergillus terreus: Glukose- und Strontiumaufnahme

Vorkultur: 6 Tage, Kulturen in Nährlösung ohne Strontium aus Sporen gewachsen
Kulturtemperatur 30° C

Zwischenkultur: 1 Tag, Mycel in Nährlösung ohne Strontium und ohne Stickstoff
Temperatur 30° C

Versuchsdauer: 2 Tage, Mycel in stickstofffreier Nährlösung mit Strontium
und 4 % Glukose

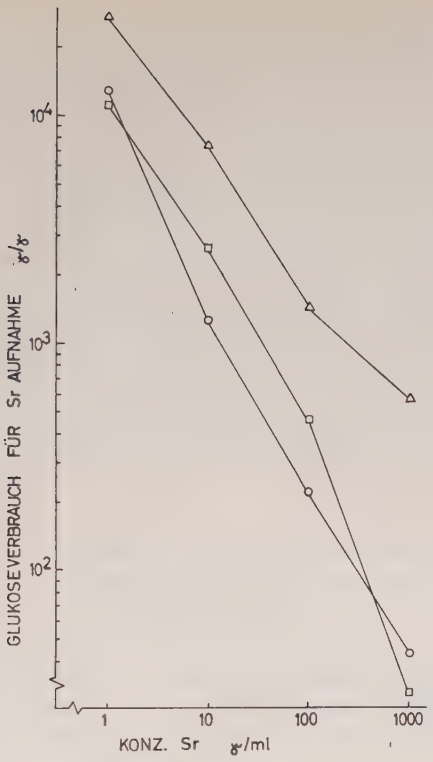
Glukoseaufnahme/Trockengewicht g/g: ○——○ 20° C, △——△ 30° C, □——□ 40° C

Strontiumakkumulation:

$$\frac{\text{Sr-Konzentration im Mycel } \gamma/\text{ml}}{\text{Sr-Endkonzentration in Kulturlösung } \gamma/\text{ml}}$$: ●——● 20° C, ▲——▲ 30° C, ■——■ 40° C

kose mehrheitlich von der Grösse der Akkumulation von Strontium abhängig war, spielte offenbar bei 20° C auch die absolute Zahl der aufgenommenen Strontiumionen eine Rolle. Dies wird noch deutlicher, wenn die vermehrte Glukoseaufnahme in γ auf die Menge des aufgenommenen Strontiums in γ bezogen wird (Fig. 7).

Nach den nun vorliegenden Ergebnissen zu schliessen, sind die untersuchten Pilze befähigt, einerseits Strontium aktiv unter Energieaufwand aufzunehmen und andererseits bei höheren Konzentrationen an Strontium



Figur 7

Aspergillus terreus: Durch Aufnahme von Strontium vermehrter Glukoseverbrauch (γ Glukose/γ Strontium)

Vorkultur: 6 Tage, Kulturen in strontiumfreier Nährlösung aus Sporen gewachsen

Zwischenkultur: 1 Tag, Mycel in Nährlösung ohne Strontium und ohne Stickstoff

Versuchsdauer: 2 Tage, Mycel in stickstofffreier Nährlösung mit Strontium und 4 % Glukose: Betriebsstoffwechsel

Versuchstemperatur: △——△ 20 °C, □——□ 30 °C, ○——○ 40 °C

bis zu einem gewissen Grad auch auszuschliessen. Eine zum Teil auch passive Aufnahme durch Diffusion bei sofortiger Bindung der aufgenommenen Strontiumionen an immobile, organische Anionen (Donnan-Gleichgewicht, s. auch Robertson, 1958) ist damit jedoch nicht ausgeschlossen.

Diskussion

Vorerst soll auf einige physiologische Wirkungen des Strontiums auf den Pilz eingegangen werden; anschliessend wird die Strontiumaufnahme durch Pilze mit derjenigen durch höhere Pflanzen verglichen.

Während mir über die Aufnahme von Strontium durch Bodenpilze keine Untersuchungen bekannt sind, liegt über die physiologische Wirkung des Strontiums auf diese Organismen einiges vor, weil das Problem der Lebensnotwendigkeit des Calciums für Pilze oft untersucht und dabei nebenher die Wirkung des Strontiums verglichen wurde. So konnten schon im letzten Jahrhundert Raulin (1869), Molisch (1894), Pfeffer (1895), Benecke (1895) und Wehmer (1895) für Pilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* kein Bedürfnis für Calcium nachweisen. In den folgenden Jahren mehrten sich die Arbeiten, in denen für einzelne Pilze die Notwendigkeit des Calciums postuliert wurde, allerdings ohne die Ergebnisse der oben zitierten Forscher grundlegend zu widerlegen. Strontium soll wenigstens teilweise das Calcium in der Förderung des Wachstums (Rippel und Stoess, 1932; Pirschle, 1935; Treschow, 1944; Steinberg, 1948; Ingraham und Emerson, 1954) und in der Förderung der Sporenbildung (Hadley, 1956; Hadley und Harrold, 1958) ersetzen können.

Da aber bei Pilzen auf künstlichen Nährmedien offensichtlich nicht lebensnotwendige Substanzen Lebensprozesse fördern können (Rippel-Baldes, 1955), wie z. B. Quecksilberchlorid das Wachstum (Rippel und Lohrmann, 1939) oder die Sporenkeimung (Nieman, 1957), ist die hier bei einigen Aspergillusarten festgestellte Wachstumsförderung durch Strontium vorläufig besser als Reizwirkung zu interpretieren oder, wie Steinberg (1946) einen solchen Effekt bezeichnet, als Wirkung von Pseudosubstituenten. Die grössere Wirkung des Strontiums gegenüber dem Calcium sowie die additive Wirkung von Strontium und Calcium deuten darauf hin.

Dennoch sind nicht alle beobachteten Wachstumsförderungen durch Strontium mit dieser Reizwirkung in Einklang zu bringen: so tritt die Wachstumsförderung nur bei intensivem Wachstum auf (s. S. 13), was auch Hadley (1956) für die Sporenbildung in Anwesenheit von Strontium bzw. Calcium feststellen konnte (keine Wirkung in Standkulturen). Auch die starke Anhäufung dieser Ionen im Mycel bei niederen Aussenkonzentrationen, was Robert (1911 und 1912) und Rennerfelt (1934) schon für Calcium festgestellt haben, spricht nicht nur für eine reine Reizwirkung dieser Ionen.

Der verringerte Wassergehalt des in strontium- oder auch in calciumhaltiger Nährlösung (s. Tab. 4, S. 15) wachsenden Mycels darf nach meiner Erfahrung nicht mit osmotischen Vorgängen erklärt werden, denn neben anderen Argumenten ist hervorzuheben, dass eine Strontiumkonzentration von 1 γ/ml die Ionenkonzentration in der Nährlösung praktisch nicht verändert; eher liegt eine entquellende Wirkung des aufgenommenen

Strontiums auf das Protoplasma, vor allem in jungen Kulturen, im Bereiche der Möglichkeit.

Die Grösse der Nährionenaufnahme hängt mehr von der Wachstumsgeschwindigkeit des Mycels ab als von der absoluten Aussenkonzentration an Nährionen, wobei, vor allem in jungen Kulturen, der Asche- und Kaliumgehalt mit steigender Strontiumkonzentration bis etwa 100 γ/ml Nährlösung abnimmt. Das Mycelwachstum wird durch Strontiumkonzentrationen von 1000 bis 5000 γ/ml noch nicht gehemmt. Lediglich die stark erhöhte Nährsalz- und Strontiumaufnahme bei 1000 γ Sr/ml könnte als pathologischer Effekt interpretiert werden. Doch tritt dieser nur in wachsenden Kulturen auf und ist auch abhängig von der Nährsalzkonzentration in der Nährlösung. In verdünnter Nährsalzlösung wird der Aschegehalt nicht beeinflusst, hingegen wird bei konzentrierter Nährsalzlösung der Aschegehalt schon bei 100 γ Sr/ml stark erhöht und beträgt bei 1000 γ Sr/ml ein Drittel des Trockengewichtes.

Wie eingangs erwähnt, liegen über die Aufnahme von Strontium bei höheren Pflanzen viele Untersuchungen vor, deren Resultate, auch der oft stark verschiedenen Kulturbedingungen wegen, zum Teil nicht übereinstimmen. In der vorliegenden Arbeit sollen die gefundenen Gesetzmässigkeiten der Strontiumaufnahme vor allem mit denjenigen, welche Läuchli (1962) für *Pisum sativum* L. und *Zea Mays* L. in unserem Institut fand, verglichen werden; darum, weil dem Verfasser der vorliegenden Arbeit die genauen Versuchsbedingungen bekannt sind und die Aufarbeitungsmethode im Prinzip dieselbe war.

Wie bei den untersuchten Pilzen, nimmt auch bei höheren Pflanzen (Collander, 1941; Russell und Squire, 1958; Läuchli, 1962) die Aufnahme von Strontium mit steigender Aussenkonzentration zu. Doch nimmt die Aufnahme durch wachsende Pilze bei niederen Strontiumgaben erst langsam, dann mit zunehmender Aussenkonzentration immer rascher zu. Im Betriebsstoffwechsel steigt die Aufnahme im Bereich niederer Dosierungen erst rasch an und verflacht sich, je höher die Aussenkonzentration an Strontium.

Im Vergleich zu *Zea* und *Pisum* (Läuchli, 1962) nehmen die untersuchten Pilze wesentlich rascher und mehr Strontium auf, und auch die Anhäufung von Strontium in den Zellen bei niederen Aussenkonzentrationen ist allgemein grösser, besonders bei langsam wachsendem Mycel. Durch *Pisum* wird bei pathologisch wirkender Strontiumkonzentration vermehrt Strontium in der Zelle angehäuft, was bei den untersuchten Pilzen nur bei starkem Wachstum festgestellt wurde. Ebenso können die Pilze bei höheren Aussenkonzentrationen an Strontium dieses teilweise ausschliessen, was für *Zea* und *Pisum*, wenn die ganze Pflanze betrachtet wird, nicht festzustellen ist.

Diese in Laborversuchen festgestellte Verschiedenheit in der Anhäufung von Strontium aus niederer Konzentration durch höhere Pflanzen bzw. Pilze deckt sich mit den von Gorham (1958 und 1959) unter natürlichen Bedingungen gefundenen Unterschieden. Gorham hat den Gehalt von langlebigen radioaktiven Substanzen, wie Strontium 90, in Angiospermen, Moosen und Flechten desselben Fund- und Standortes bestimmt und dabei eine Zunahme der Radioaktivität in der Reihenfolge der angegebenen Organismen gefunden. (Als Bezugswert wählte Gorham das Aschegewicht, somit wurde das langsame Wachstum der Flechten berücksichtigt.) Es darf daher angenommen werden, dass unter natürlichen Bedingungen auch die nicht symbiotisch (mit autotrophen Pflanzen) wachsenden Pilze mehr Strontium aus niederer Aussenkonzentration aufnehmen als die höheren Pflanzen, um so mehr als die Wachstumsgeschwindigkeit des Mycels unter natürlichen Bedingungen wesentlich geringer ist als in Schüttelkulturen; was ja auch schon beim Vergleich der Aufnahme in Standkulturen deutlich wurde. Zudem konnten Gonzales und Jenny (1958) nachweisen, dass die Aufnahme von radioaktivem Strontium grösser ist, wenn dieses nicht frei in Lösung, sondern an Ionenaustauscherharz oder Austauschermembranen gebunden ist; ein solcher Effekt dürfte auch bei Pilzen möglich sein.

Höhere Pflanzen nehmen Strontium gleich rasch wie Calcium (Collander, 1941; Russell und Squire, 1958) oder sogar rascher als Calcium auf (Menzel und Held, 1955). Dafür sprechen auch die Angaben von Bowen und Dymond (1956), welche bei niederen Aussenkonzentrationen mehr Strontium als Calcium in Wurzeln fanden. Für die untersuchten Pilze gilt, dass bei niederen Aussenkonzentrationen mehr Calcium als Strontium, bei höheren Aussenkonzentrationen mehr Strontium als Calcium aufgenommen wird. Dieser Unterschied in der Aufnahme der genannten Ionen bei niederen Aussenkonzentrationen ist insofern bemerkenswert, als, im Gegensatz zu höheren Pflanzen, in den untersuchten Pilzen auch für das Calcium keine physiologisch wichtige Funktion bekannt ist.

Bei den untersuchten Pilzen wurde für die Hemmung der Strontiumaufnahme durch Calcium festgestellt, dass dafür nicht die Menge des Calciums allein, sondern das Verhältnis der Ionenzahl Strontium/Calcium in der Nährlösung massgebend ist; genauer: dass die Strontiumaufnahme erst dann durch Calcium gehemmt wird, wenn das Strontium-Calcium-Verhältnis in der Nährlösung grösser ist als 0,5. Eine gewisse Bestätigung dafür findet sich in Angaben für höhere Pflanzen (Läuchli, 1962), indem eine Erhöhung der Calciumkonzentration erst von einer bestimmten Strontiumkonzentration an die Aufnahme von Strontium wesentlich verringert; eine Tatsache, auf die schon Collander (1941) und Russell und Squire (1958) hingewiesen haben.

Schwieriger wird ein Vergleich des Aufnahmemechanismus bei Pilzen und höheren Pflanzen, weil nicht nur die chemische Zusammensetzung der Zellmembran, sondern der ganze morphologische Bau grundlegend verschieden ist. Ein Transpirationsstrom, der in Oberflächenkulturen von Pilzen nachgewiesen werden kann (Sprecher, 1961), fällt beim submers wachsenden Mycel weg; auch der Stofftransport von Zelle zu Zelle dürfte unter dieser Kulturbedingung gering sein (Sprecher, 1961). (Eine vorwiegende Strontiumaufnahme mit dem Wasser, welches später als Guttationswasser abgegeben wird, ist nicht wahrscheinlich und wäre zudem auch energieabhängig.) Der mittlere Weg der Stoffaufnahme beschränkt sich daher bei den untersuchten Pilzen auf maximal eine halbe Zellbreite. Interessant ist nun, dass auch für höhere Pflanzen an isolierten Wurzeln (kein Transpirationsstrom, daher verringerter und auf relativ kurze Distanz beschränkter Ionentransport) nachgewiesen wurde, dass Strontium auch aktiv unter Energieaufwand der Zelle aufgenommen wird (Jacobson und Overstreet, 1947; Epstein und Leggett, 1954).

Zusammenfassung

1. Einige Gesetzmässigkeiten der Strontiumaufnahme durch *Aspergillus* und *Penicillium* wurden untersucht. Spezielle Untersuchungen wurden mit *Aspergillus terreus* Thom 1960 durchgeführt. Die Pilze wuchsen submers, meist in Schüttelkulturen. Das Mycel wurde nass mit HNO_3 verascht; die Bestimmung des Strontiums, Calciums und Kaliums in der Aschelösung erfolgte flammenspektrophotometrisch.

2. In der konzentrationsabhängigen Strontiumaufnahme verhalten sich alle untersuchten Pilze qualitativ gleich. Hinsichtlich der quantitativen Aufnahme ergibt sich ein Gattungsunterschied, indem im Mittel die untersuchten *Aspergilli* mehr Strontium aufnahmen als die *Penicilli*.

3. Langsam wachsendes Mycel nimmt absolut und relativ mehr Strontium auf als raschwachsendes Mycel desselben Pilzes.

4. Die Gesetzmässigkeit der Aufnahme in Kulturen mit überwiegendem *Baustoffwechsel* und solchen mit vorwiegendem *Betriebsstoffwechsel* ist grundsätzlich verschieden: in der Wachstumsphase steigt die relative Aufnahme bei niederen Strontiumdosierungen in der Nährlösung erst langsam, dann mit zunehmender Aussenkonzentration immer rascher an. – Bei mehrheitlichem Betriebsstoffwechsel steigt die Aufnahme im Bereich niederer Dosierungen erst rasch an und verflacht sich, je höher die Aussenkonzentration an Strontium.

5. Bei niederen Aussenkonzentrationen wird Strontium rasch und stark akkumuliert. Mit steigender Aussenkonzentration nimmt die Geschwindigkeit und Grösse der Anhäufung von Strontium im Mycel ab.

6. Soweit untersucht (5000 γ Sr/ml), ist keine schädigende Wirkung von Strontium auf das Wachstum festzustellen. Doch bewirken hohe Konzentrationen eine erhöhte Ionenaufnahme (inkl. Sr) in stark wachsenden Kulturen; in langsam oder nicht wachsenden Kulturen wird Strontium bei diesen Aussenkonzentrationen ausgeschlossen.

7. Nährionen werden im Mycel stärker angehäuft als Calciumionen, letztere wiederum stärker als Strontiumionen.

8. Stark erhöhte Kaliumgaben hemmen die Strontiumaufnahme, besonders stark bei hohen Strontiumzusätzen.

9. Aus niederer Konzentration wird mehr Calcium als Strontium, aus hohen Dosierungen mehr Strontium als Calcium aufgenommen.

10. In der Aufnahme beeinflussen sich die Strontium- und Calciumionen. Calcium hemmt die Strontiumaufnahme, wenn das Strontium-Calcium-Ionenverhältnis grösser, ca. 0,5 ist; Strontium hemmt die Calciumaufnahme, wenn dieses Verhältnis kleiner, ca. 0,5 ist. Auch wenn das Strontium-Calcium-Verhältnis in der Nährlösung stark variiert wird (von 0,01 bis 500), so bleibt die Variation dieses Verhältnisses in den Pilzzellen klein und nimmt den Wert 0,5 an, selbst wenn das Calcium-Strontium-Verhältnis zwischen 0,1 und 10 variiert wurde.

11. Die Strontiumaufnahme durch Mycel im Betriebsstoffwechsel ist temperaturabhängig: mit ansteigender Temperatur nimmt die Aufnahme zu, besonders in dem für das Wachstum stark unteroptimalen Temperaturbereich. Der Temperatureffekt ist grösser bei geringerer Glukosekonzentration.

12. Aufgenommenes Strontium wird vor allem in jungen Kulturen grösstenteils rasch wieder in strontiumfreie Nährlösung abgegeben. In Anwesenheit von Calciumionen erfolgt eine zusätzliche, vom Alter unabhängige, langsame Abgabe.

13. Es muss angenommen werden, dass Strontium teilweise aktiv unter Arbeitsleistung in die Zelle aufgenommen wird: Strontium ist in der Zelle mehrheitlich nicht oder nur locker gebunden; der durch die Strontiumaufnahme vermehrte Glukoseverbrauch ist vorwiegend von der Grösse der Akkumulation und weniger von der Zahl der aufgenommenen Strontiumionen abhängig: Verminderung oder Blockierung der Atmung hemmt die Strontiumaufnahme.

Die vorliegende Arbeit entstand im *Botanischen Institut der Universität Basel* auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Max Geiger-Huber, dem ich für seine Hilfe und sein ständiges Interesse bestens danke.

Die *Kommission für Atomwissenschaft* hat die Arbeit durch Gewährung finanzieller Unterstützung wesentlich gefördert, wofür auch hier bestens gedankt sei.

Da diese Untersuchungen neben meiner Tätigkeit als Assistent ausgeführt wurden, stand mir nur eine beschränkte Arbeitszeit zur Verfügung. Ich bin daher Herrn Prof. Geiger-Huber zu besonderem Dank verpflichtet, dass er mir Laborantinnen zur Mithilfe bei umfangreichen Versuchen zur Verfügung gestellt hat. Den Laborantinnen Frl. M. Petersen, E. Daniel und I. Mähling danke ich für ihre Mitarbeit. Ebenso danke ich dem technischen Angestellten des Institutes, Herrn H. Müller, für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Zitierte Literatur

Aso K. 1900. Bull. Coll. Agr. Tokyo Imp. Univ. **4**, 81–96. Tabelle in Foster, 1949, S. 139.

Behr G. 1930. Autolyse bei *Aspergillus niger*. Arch. Mikrobiol. **1**, 418–444.

Benecke W. 1895. Die zur Ernährung der Schimmelpilze notwendigen Metalle. Jb. wiss. Bot. **28**, 487–530.

Bowen H.J.M. und J.A. Dymond. 1956. The uptake of Calcium and Strontium by plants from soils and nutrient solutions. J. Exp. Bot. **7**, 264–272.

Collander R. 1941. Selective Absorption of Cations by higher plants. Plant Physiol. **16**, 691–720.

Ehrler W.L., E.M. Romney und K.C. Hamner. 1955. The effect of certain environmental Factors on Calcium, Phosphorus and Strontium uptake by Barley. UCLA **351**, 22 S.

Emmenegger T. 1954. Vergleichende Untersuchungen über das Bildungsvermögen verschiedener Arten von *Aspergillus* für Lactoflavin. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **64**, 453 bis 486 (Diss. Basel).

Epstein E. 1956. Die Beeinflussung der Stoffaufnahme: Uptake and ionic Environment. Handb. d. Pflanzenphysiologie **2**, 398–408. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

— und J.L. Leggett. 1954. The absorption of alkaline earth cations by barley roots. Amer. J. Bot. **41**, 785–791.

Fisher R.A. 1946. Statistical Methods for Research Workers. Oliver and Boyd, Edinburgh, London.

— und Fr. Yates. 1948. Statistical Tables for agricultural and medical Research. Oliver and Boyd, London, Edinburgh.

Foster J.W. 1949. Chemical Activities of Fungi. 137–145, New York.

— L.E. McDaniel et al. 1945. Microbiological aspects on penicillin: V. Conidiospore formation in submerged cultures *Penicillium notatum*. J. Bact. **50**, 365–368.

Frei P. 1963. Die Aufnahme von Strontium durch *Zea Mays* L. in Mischkultur mit Bodenpilzen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **73**, 21–58 (Diss. Basel).

Gonzales J. de Dios Lopez und H. Jenny. 1958. Modes of entry of Strontium into plant roots. Science **128**, 90–91.

Gorham E. 1958. Accumulation of radioactive fall out by plants in the English Lake District. Nature **181**, 1523–1524.

— 1959. A comparison of lower and higher plants as accumulators of radioactive fall out. Canadian Jour. Bot. **37**, 327–329.

Hadley G. 1956. The sporulation of *Penicillium notatum* in submerged cultures. Thesis University of Birmingham.

— und G. Harrold. 1958. The sporulation of *Penicillium notatum* Westling in submerged liquid cultures. J. Exp. Bot. **9**, I, 408–417; II, 418–425.

Ingraham J.L. und R. Emerson. 1954. Studies on the nutrition and metabolism of the aquatic Phycomycete *Allomyces*. Amer. J. Bot. **41**, 146–152.

Jacobson L. und R. Overstreet. 1947. A study of the mechanism of ion absorption by plant roots using radioactive elements. Amer. J. Bot. **34**, 415–420.

— D.P. Moore und R. Hannapel. 1960. Role of Calcium in absorption of monovalent cations. Plant Physiol. **35**, 352–358.

Janke A. 1946. Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. S. 166. Leipzig.

Klechkovsky V.M. 1957. On the behavior of fission products in soil, their absorption by plants, their accumulation in crops (translated from Russian). AEC-TR **2867**, 227 S.

Kluyver A.J. und L.H.C. Perquin. 1933. Zur Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchungen. Biochem. Ztschr. **266**, 68–81.

König E. 1961. Untersuchungen über den Chemotropismus einiger Pilze gegenüber schwerlöslichen Phosphaten. Arch. Mikrobiol. **40**, 395–402.

Läuchli A. 1962. Über die Aufnahme von Strontium durch höhere Pflanzen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **72**, 147–197 (Diss. Basel).

Libby W.F. 1958. Beneficiation of soils contaminated with Sr^{90}; beneficial effects of Potassium. Science **128**, 1134–1135.

Meder H. 1952. Über die Bedingungen der Bildung von Fumarsäure als Endprodukt des Stoffwechsels bei *Rhizopus*-Arten. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **62**, 164–204 (Diss. Basel).

Menzel R.G. und W.R. Held. 1955. Distribution of Potassium, Rubidium, Cesium and Calcium, Strontium within plants grown in nutrient solutions. Soil Science **80**, 287–293.

Molisch H. 1894. Die mineralische Nahrung der niederen Pilze. Bot. Centralbl. **60**, 167–168.

Nelson N. 1944. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. **153**, 375–380.

Nieman E. 1957. Stimulationswirkung von Quecksilberverbindungen auf die Sporenkeimung des Zwergsteinbrandes (*Tilletia controversa* Kühn). Angew. Bot. **31**, 191–196.

Olsen C. 1948. The mineral, nitrogen and sugar content of Beech Leaves and Beech Leaf sap at various times. C. r. Trav. Labor. Carlsberg, Sér. chim. **26**, 197–230.

Pedretti E. 1958. Über Bestimmung und Verteilung autochthoner Spurenelemente in jungen Maispflanzen. S. 106–108. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **68**, 103–144 (Diss. Basel).

Pfeffer W. 1895. Über Election organischer Nährstoffe. Jahrb. wiss. Bot. **28**, 205–268.

Pirschle K. 1935. Vergleichende Untersuchungen über die physiologische Wirkung der Elemente nach Wachstumsversuchen mit *Aspergillus niger* (Stimulation und Toxizität). Planta **23**, 177–224.

Raulin J. 1869. Etudes chimiques sur la végétation. Ann. Sci. Nat. 5^{e} Sér. bot. **11**, 93–299.

Rennerfelt E. 1934. Untersuchungen über die Salzaufnahme bei *Aspergillus niger*. Planta **22**, 221–239.

Rippel A.-Baldes 1955. Grundriss der Mikrobiologie. S. 49, 99, 158–159. Springer-Verlag.

— und W. Lohrmann. 1939. Effects of nutrients and poisons. Chem. Abstr. **35**, 5931.

— und Stoess. 1932. Ist Calcium ein für Mikroorganismen notwendiges Element? Arch. Mikrobiol. **3**, 492–506.

Robert M. 1911. Influence du calcium sur le développement et la composition minérale de l'*Aspergillus niger*. C. r. Acad. Sci. Paris **153**, 1175–1177.

— 1912. Mode de fixation du calcium par l'*Aspergillus niger*. C. r. Acad. Sci. Paris **154**, 1308–1311.

Robertson R.N. 1958. The Uptake of Minerals. Handb. d. Pflanzenphysiologie **4**, 243 bis 279. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

Russell R.S. und H.M. Squire. 1958. The absorption and distribution of Strontium in Plants. I. Preliminary studies in water culture. J. Exp. Bot. **9**, 262–276.

Schaub H. 1958. Die Milchsäurebildung bei *Rhizopus chinensis* Saito, S. 71–72. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **68**, 64–102 (Diss. Basel).

Sprecher E. 1961. Über Stoffausscheidungen von Pilzen. Arch. Mikrobiol. **35**, 114–155.

Steinberg R.A. 1942. Influence of carbondioxyde on response of *Aspergillus niger* to trace elements. Plant Physiol. **17**, 129–132.

— 1946. Specifity of Potassium and Magnesium for growth of *Aspergillus niger*. Amer. J. Bot. **33**, 210–214.

— 1948. Essentiality of Calcium in the nutrition of fungi. Science **107**, 423.

Treschow C. 1944. Nutrition of the cultivated mushrooms. Dansk Botanisk Arkiv **11**.

Vakil J.R. et al. 1961. Effect of CO_2 on the germination of conidiospores of *Aspergillus niger* (A 5). Arch. Mikrobiol. **39**, 53–57.

Viets F.G. 1944. Calcium and other polyvalent cations as accelerators of Ion-accumulation by excised Barley roots. Plant Physiol. **19**, 466–480.

Wagner B. 1928. Tabellen zum Eintauchrefraktometer. 2. Auflage. Selbstverlag, Sondershausen.

Waterhouse D.F. 1957. Histochemical detection of Barium and Strontium. Australian Journ. of Scientific Research, Series B, **4**, 144.

Wehmer C. 1895. Zur Frage nach dem Wert der einzelnen Mineralsalze für Pilze. Ber. Deutsch. Bot. Ges. **13**, 257–265.

Zhurbitzky Z.J. und D.V. Shtrausberg. 1958. The effect of temperature on the mineral nutrition of plant. Proc. First (Unesco) Internat. Conf. Sci. Res. **4**, 270–285.